

DIN 10118

ICS 07.100.30

**Untersuchung von Lebensmitteln –
Nachweis von Verotoxin-bildenden *Escherichia (E.) coli*-Stämmen
(VTEC) in Lebensmitteln tierischer Herkunft**

Analysis of foodstuffs –

Detection of verotoxine-forming *Escherichia (E.) coli*-strains (VTEC) in food derived from animals

Analysis pour produits alimentaires –

Recherche d'embranchement d'*Escherichia (E.) coli* (VTEC) formant des verotoxines dans des aliments qui dérivent d'animaux

Gesamtumfang 20 Seiten

Normenausschuss Lebensmittel und landwirtschaftliche Produkte (NAL) im DIN

Inhalt

	Seite
Vorwort.....	3
1 Anwendungsbereich.....	3
2 Normative Verweisungen	3
3 Begriffe.....	3
4 Kurzbeschreibung.....	4
5 Chemikalien, Reagenzien und Nährböden	5
6 Geräte und Hilfsmittel.....	14
7 Probenahme	16
8 Probenvorbereitung.....	16
9 Durchführung	16
10 Bestätigung von VTEC	18
11 Auswertung	18
12 Untersuchungsbericht.....	18
Anhang A (normativ) Ausstreichen der Probe für den VT-Kolonie-Immunoblot.....	20
Literaturhinweise	20

Vorwort

Diese Norm wurde vom Normenausschuss Lebensmittel und landwirtschaftliche Produkte (NAL), Arbeitsausschuss „Mikrobiologische Lebensmitteluntersuchung einschließlich Schnellverfahren“, erarbeitet.

1 Anwendungsbereich

Diese Norm legt ein Verfahren zum Nachweis und zur Isolierung von Verotoxin-bildenden *E.coli*-Stämmen (VTEC) in Lebensmitteln tierischen Ursprungs fest.

ANMERKUNG Für den Begriff „Verotoxin“ wird synonym auch „Shigatoxin“, für Verotoxin-bildende *E.coli* entsprechend Shigatoxin-bildende *E.coli* (STEC) verwendet.

2 Normative Verweisungen

Diese Norm enthält durch datierte oder undatierte Verweisungen Festlegungen aus anderen Publikationen. Diese normativen Verweisungen sind an den jeweiligen Stellen im Text zitiert, und die Publikationen sind nachstehend aufgeführt. Bei datierten Verweisungen gehören spätere Änderungen oder Überarbeitungen dieser Publikationen nur zu dieser Norm, falls sie durch Änderung oder Überarbeitung eingearbeitet sind. Bei undatierten Verweisungen gilt die letzte Ausgabe der in Bezug genommenen Publikationen (einschließlich Änderungen).

DIN EN ISO 6887-1 *Mikrobiologie von Lebensmitteln und Futtermitteln — Vorbereitung von Untersuchungsproben und Herstellung von Erstverdünnungen und von Dezimalverdünnungen für mikrobiologische Untersuchungen — Teil 1: Allgemeine Regeln für die Herstellung von Erstverdünnungen und Dezimalverdünnungen (ISO 6887-1:1999); Deutsche Fassung EN ISO 6887-1:1999.*

DIN EN ISO 6887-2 *Mikrobiologie von Lebensmitteln und Futtermitteln — Vorbereitung von Untersuchungsproben, von Erstverdünnungen und von Dezimalverdünnungen für mikrobiologische Untersuchungen — Teil 2: Spezifische Regeln für die Vorbereitung von Fleisch und Fleischerzeugnissen (ISO 6887-2:2003); Deutsche Fassung EN ISO 6887-2:2003.*

DIN EN ISO 8261 *Milch und Milchprodukte — Allgemeiner Leitfaden für die Vorbereitung von Untersuchungsproben und die Herstellung von Anschüttelungen und Dezimalverdünnungen für mikrobiologische Untersuchungen (ISO 8261:2001); Deutsche Fassung EN ISO 8261:2001.*

ISO 7218, *Microbiology of food and animal feeding stuffs — General rules for microbiological examinations.*

ISO 7218 AMD1, *Microbiology of food and animal feeding stuffs — General rules for microbiological examinations; Amendment 1.*

3 Begriffe

Für die Anwendung dieser Norm gelten die folgenden Begriffe.

3.1

Verotoxin-bildende *E.coli*

Mikroorganismen, die Verotoxin(e) bilden und bei der Untersuchung nach diesem Verfahren die hier beschriebenen immunchemischen und biochemischen Eigenschaften besitzen

3.2

immunchemische Verfahren

3.2.1

immunologisches Testsystem

Testsystem, bei dem Antigene oder Antikörper an eine feste Phase gebunden sind. Der Nachweis korrespondierender Antikörper oder Antigene erfolgt über eine Antigen-Antikörper-Reaktion, die direkt oder über Folgereaktionen mittels enzym- oder anders markierter (z. B. über Gold- oder Latexpartikel) Antikörper oder Antigene nachgewiesen wird

BEISPIEL Enzyme-Linked-Immuno-Sorbent-Assay (ELISA) oder Enzyme-Immuno-Assay (EIA) oder
immunochromatographischer Assay

3.2.2

Verotoxin (VT)-Kolonie-Immunoblot

Verfahren, das aufgrund einer speziellen Doppelmembran-Technik nach Beimpfung, Inkubation und Durchführung eines immunologischen Reaktionsschrittes mit anschließender Farbreaktion die Identifikation und Isolierung der gesuchten Bakterienspezies über den Nachweis des gebildeten Toxins ermöglicht

4 Kurzbeschreibung

Der Nachweis und die Isolierung von VTEC erfordert mehrere, nachfolgend aufgeführte Arbeitsschritte.

4.1 Voranreicherung

Die Lebensmittelprobe wird als Schüttelkultur in modifizierte Caseinpepton-Sojamehlpepton-Bouillon mit Novobiocin nach 5.2 für 6 h bei 37 °C bebrütet.

4.2 Anreicherung für gesteigerte Verotoxinexpression

Eine bestimmte Menge der Voranreicherungskultur wird in modifizierte Caseinpepton-Sojamehlpepton-Bouillon mit Zusatz einer die Verotoxinexpression steigernden Substanz wie Mitomycin C, Carbadox oder einer vergleichbar wirkenden Substanz (5.3) überführt und 16 h bis 18 h bei 37 °C angereichert.

WARNUNG — Carbadox und Mitomycin C sind gesundheitsschädlich. Bei der Behandlung von Carbadox und Mitomycin C müssen geeignete Sicherheitsmaßnahmen angewendet werden.

4.3 Nachweis von Verotoxin(en)

Aus der Anreicherungskultur erfolgt der Nachweis von Verotoxinen mit Hilfe eines immunchemischen Verfahrens, z. B. Enzyme-Immuno-Assay (EIA) oder Enzyme-Linked-Immuno-Sorbent-Assay (ELISA).

4.4 Isolierung

Bei einem nach 4.3 positiven Testergebnis werden die präsumtiven Verotoxin-bildenden *E.coli* mittels Immunoblot-Verfahren isoliert. Dazu werden aus der aufbereiteten Voranreicherung (9.4.2) 0,1 ml auf Syncase-Agar mit Enhancer (5.4.1) ausgestrichen und 18 h bei 37 °C bebrütet. Nach Durchführung eines immunologischen Reaktionsschrittes mit anschließender Färbung werden bis zu 10 Kolonien mit positiver Farbreaktion weitergehend untersucht.

5 Chemikalien, Reagenzien und Nährböden

5.1 Allgemeines

Zur üblichen Laborpraxis siehe ISO 7218.

Die Nährbodenbestandteile und Chemikalien müssen für mikrobiologische und immunchemische Zwecke geeignet sein. Um vergleichbare Ergebnisse zu erhalten, sollten eindeutig deklarierte Nährbodenbestandteile und analysenreine Chemikalien oder Trockennährböden verwendet werden. Den Anweisungen des Herstellers ist strikt zu folgen. Das verwendete Wasser muss entweder in Glasgeräten destilliert oder demineralisiert und mindestens von entsprechender Reinheit sein. Es darf keine Bestandteile enthalten, die das Wachstum von Mikroorganismen beeinflussen.

ANMERKUNG Geeignete Fertignährmedien, Reagenzien oder Testkits sind im Fachhandel erhältlich und dürfen eingesetzt werden, soweit sie in ihrer Zusammensetzung den beschriebenen Nährmedien, Reagenzien und Testkits entsprechen oder nur geringfügig bei vergleichbarer Wirksamkeit von diesen abweichen.

5.2 Nährmedium für die Voranreicherung

5.2.1 Modifizierte Caseinpepton-Sojamehlpepton-Bouillon (modified Tryptic-Soy-Broth, mTSB) mit Novobiocin

5.2.1.1 Grundmedium

5.2.1.1.1 Zusammensetzung

Casein, enzymatisch verdaut	17 g
Sojamehl, enzymatisch verdaut	3 g
D(+)-Glucose	2,5 g
Natriumchlorid	5 g
Dikaliumhydrogenphosphat	4 g
Gallensalze	1,5 g
Wasser	1 000 ml

5.2.1.1.2 Herstellung

Die Bestandteile werden in der angegebenen Wassermenge gelöst und 15 min in einem Autoklaven (6.4) bei $121\text{ °C} \pm 1\text{ °C}$ sterilisiert. Der pH-Wert ist so einzustellen, dass er nach dem Sterilisieren bei $7,3 \pm 0,2$ liegt, bezogen auf eine Temperatur von 25 °C .

Das Grundmedium ist luftdicht verschlossen bei $5\text{ °C} \pm 3\text{ °C}$ für mindestens acht Wochen lagerungsfähig.

ANMERKUNG 1 Der pH-Wert sollte vor dem Sterilisieren auf 7,6 bis 7,7 eingestellt werden.

ANMERKUNG 2 Bei Fleisch und Fleischerzeugnissen kann auch Brillantgrün-Galle-Lactose-Bouillon (BRILA) verwendet werden.

5.2.1.2 Novobiocin-Supplement

5.2.1.2.1 Zusammensetzung

Novobiocin-Lösung, $\rho = 10 \text{ mg/ml}^1$)

5.2.1.2.2 Herstellung

Das Novobiocin wird in der in 5.2.1.2.1 angegebenen Konzentration in Wasser gelöst. Die Lösung wird sterilfiltriert (6.30) und ist sofort nach Herstellung zu verwenden.

Die Lösung kann bis zu 6 Monate bei -20°C oder -80°C aufbewahrt werden. Nach dem Auftauen muss sie sofort verwendet werden.

5.2.1.3 Vollständiges Nährmedium

5.2.1.3.1 Zusammensetzung

Grundmedium (5.2.1.1)	1000 ml
Novobiocin-Lösung (5.2.1.2)	1 ml

5.2.1.3.2 Herstellung

Dem auf 45°C bis 50°C abgekühlten Grundmedium wird je Liter 1 ml Supplement (5.2.1.2) zugesetzt. Das vollständige Nährmedium ist am Tage der Herstellung zu verwenden.

ANMERKUNG Novobiocin-Stammlösungen mit anderen Konzentrationen dürfen verwendet werden, sofern die Endkonzentration des Novobiocins im gebrauchsfertigen Nährmedium nicht verändert wird.

5.3 Nährmedium für die Anreicherung

5.3.1 modifizierte Caseinpepton-Sojamehlpepton-Bouillon (modified Tryptic-Soy-Broth, mTSB) mit Enhancer-Zusatz

5.3.1.1 Grundmedium

Als Grundmedium wird mTSB nach 5.2.1.1 verwendet.

5.3.1.2 Supplement (Enhancer)

5.3.1.2.1 Zusammensetzung

— Mitomycin C-Lösung, $\rho = 0,02 \text{ mg/ml}^1$)

oder

— Carbadox-Lösung, $\rho = 1,0 \text{ mg/ml}^1$)

1) ρ Massenkonzentration